

## 糸状菌における効率的多重遺伝子導入系の開発

江原 直樹<sup>1</sup>・水谷 治<sup>2</sup>・五味 勝也<sup>1\*</sup>

ペニシリンはアオカビ*Penicillium chrysogenum*によって生産される代表的な抗生物質であるが、この例をあげるまでもなく糸状菌は放線菌とともに多種類の二次代謝化合物生産菌の一大宝庫である。医薬品の中で現在もっとも市場規模の大きいスタチン類も糸状菌の生産する二次代謝化合物がベースとなっている。糸状菌は多種多様な二次代謝化合物を生産する能力を持つことから、高度に発達した二次代謝化合物の生産機構の存在が示唆されるとともに、近年の糸状菌ゲノム情報の整備によりその生合成経路の輪郭が明らかにされつつある。糸状菌や放線菌が生産する二次代謝化合物は多数の生合成ステップを経て合成されるが、これらの一連の生合成過程に関わる酵素群、すなわち生合成マシナリーを構成する酵素の遺伝子はクラスター構造を形成しており、クラスター内の遺伝子群が協調的に発現することにより、複雑な構造をもつ化合物が生産される。これまで明らかにされてきたゲノム情報によると、糸状菌はきわめて多数の二次代謝化合物の生合成遺伝子クラスターを有しており、たとえば、麹菌*Aspergillus oryzae*のゲノムには二次代謝化合物の生合成遺伝子クラスターが約50個推定されている<sup>1)</sup>。一方、麹菌は他の同属糸状菌に比べ多くの二次代謝関連遺伝子を保有しているものの、その多くはほとんど発現しておらず、自身が生産する代謝産物のバックグラウンドが低く、そのため純度の高い物質生産システムの構築が可能なクリーンホストとして利用できることが示されている。しかし、生合成マシナリーの構成酵素遺伝子を自由に操作して麹菌内に導入し、目的の化合物を高効率・高生産する手法は未だ確立していないのが現状である。

糸状菌では放線菌のように遺伝子クラスターがオペロン構造を取っていないので、生合成遺伝子をそれぞれ高発現プロモーターに連結して導入する必要がある。そのため、甜菜じゃのめ病菌*Phoma betae*由来DNAポリメラーゼ阻害剤であるアフィデコリンの生産では、4つの生合成遺伝子をそれぞれ異なる選択マーカーを用いて、個別に麹菌に導入することにより高生産を達成している<sup>2)</sup>。しかし、麹菌では利用できる選択マーカーが限られているため、生合成マシナリーの構成遺伝子が多い場合には、それらをすべて導入して目的化合物の生産を行うこ

とは困難である。そこで、筆者らは選択マーカーの効率的なリサイクリング方法としてCre/*loxP*システムを利用して、二次代謝化合物の生合成マシナリーの多重遺伝子導入法の開発を試みた<sup>3)</sup>。

Cre/*loxP*を利用した選択マーカーリサイクリング

近年、麹菌をはじめとする糸状菌で、非相同末端結合反応に関する遺伝子を破壊することにより、相同組換え頻度の高い宿主が開発されている。この宿主を用いて、選択マーカーの両端に相同領域を配置したものを染色体上に導入し、相同組換えでマーカーの除去を行う手法が開発され、多重遺伝子破壊株の取得にも成功している<sup>4)</sup>。しかし、この手法では脱落効率が低く労力を要するため、より迅速にマーカー除去株を取得できるように、部位特異的組換え酵素反応を介したマーカー除去システムを検討した。部位特異的組換え酵素系としては、バクテリオファージP1由来のCre/*loxP*や出芽酵母由来のFLP/*FRT*などのシステムが知られている。特に、Cre/*loxP*は原核生物から哺乳類に至るまで広く利用されており、条件的遺伝子ノックアウトや選択マーカーのリサイクリングにもよく用いられていることから、ここではCre/*loxP*システムを採用することとした。

**細胞内Cre直接導入法** Creリコンビナーゼ (Cre) は343アミノ酸残基からなり、チロシンリコンビナーゼファミリーに属するタンパク質である。Creは、8 bp (スペーサー) が対称配列の13 bp (アーム) で両側を挟まれた34 bpからなる*loxP*配列が同一DNA鎖上に2個存在すると、両者の*loxP*間で部位特異的な組換えを起こす。ただし、Cre反応の結果は両者の*loxP*の向きにより異なり、2つの*loxP*が逆である場合は*loxP*に挟まれた領域は反転し、向きが同一である場合、*loxP*に挟まれた領域は切り出しを受け環状配列としてDNA鎖から脱落する。すなわち、選択マーカーの両端に*loxP*配列を同一の向きで配置して染色体上に導入し、細胞内でCreを作用させることにより、マーカー領域のみを特異的に脱落させることができる。Creを細胞内で作用させる方法としては、一般的にCre発現カセットを有するプラスミドを細胞内に導入し、染色体上に組み込むことなく条件的にCreを発現させるCre細胞内発現法が行われており、

\* 著者紹介 <sup>1</sup>東北大学大学院農学研究科生物産業創成科学専攻 (教授) E-mail: gomi@biochem.tohoku.ac.jp<sup>2</sup>独立行政法人酒類総合研究所

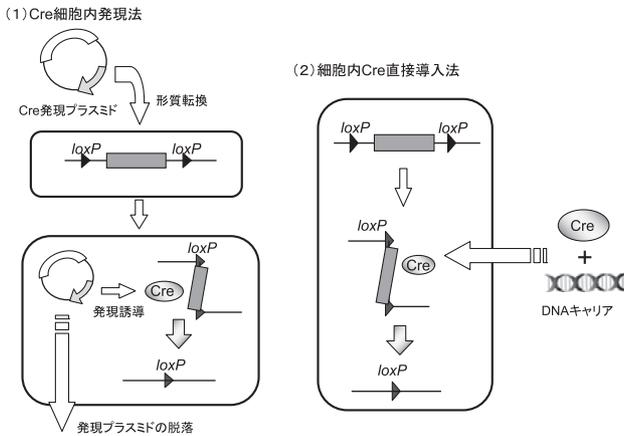


図1. Cre/loxPシステムを利用した選択マーカーリサイクリング法。従来法であるCreを細胞内で発現させる方法(1)とCreを細胞内に直接導入する方法(2)。

*Aspergillus fumigatus* や *Aspergillus nidulans* でも遺伝子破壊に使用した選択マーカーの脱落に成功している<sup>5,6)</sup>。しかし、この手法を多重遺伝子導入に応用する場合には、目的遺伝子の染色体への導入、Cre発現プラスミドの導入、マーカー除去株の選抜、さらにCre発現プラスミドの脱落という4つのステップを何度も繰り返すことになり、きわめて煩雑な工程となる(図1)。

そこで、この工程を簡略化する手法として、細胞壁を酵素処理により消化した麹菌のプロトプラストに対して、外部から市販のCreを導入することにより、loxP配列に挟まれたマーカー遺伝子を除去することを試みた。この方法は、restriction enzyme-mediated integration (REMI) 法に準じたもので、プロトプラストと酵素を混ぜ、ポリエチレングリコールとCaCl<sub>2</sub>存在下で細胞融合を起こさせると同時に細胞内に酵素を取り込ませるものである。条件検討の結果、酵素キャリアとして何らかのDNA断片をCreと一緒に用いることで、効率よく麹菌細胞内でマーカー遺伝子の除去が可能であることを見いだした。この手法により遺伝子破壊を簡便かつ迅速に繰り返して行うことができ、多重マーカーを付与した宿主の造成为容易になった<sup>7)</sup>。

**変異型loxP配列を用いたCre/loxPシステム** 一方、生合成遺伝子の多重導入にCre/loxPシステムを用いる場合に問題となるのが、染色体上へのloxP配列の蓄積である。すなわち、Cre/loxP反応により必ず1つのloxP配列は染色体上に残存することになるため、遺伝子導入とマーカー除去反応を繰り返すと、染色体上にloxP配列が複数蓄積することになる。loxP配列が染色体上の近傍に複数存在する場合に次のCre反応を行うと、これ

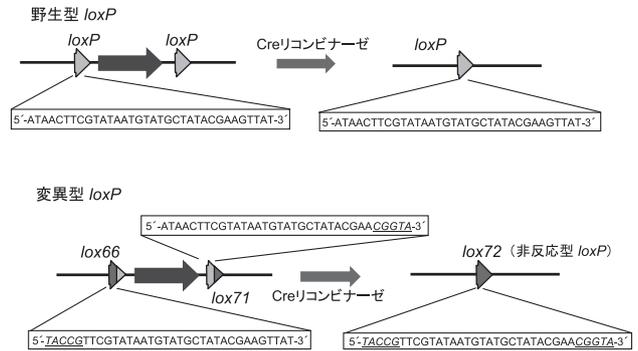


図2. 野生型および変異型loxPの配列とCre反応によって生成する配列

らのloxP間で望まない組換え反応が起こり、導入した遺伝子群が除去されてしまうことが危惧される。そこで、意図しない遺伝子の脱落を避けるために、変異型loxPを利用することとした。loxP配列にはさまざまな変異型配列が報告されているが、左右両方のアームに変異を有するlox72という変異型loxPは、Creによる認識効率が著しく低下し、ほとんどCre反応を受けないことが知られている。一方、変異を片側のアームのみに有する変異型loxP (lox66, lox71) はCre反応の標的となり、この変異型loxPペアを選択マーカーの両端に設計することにより、マーカー除去後は染色体上に非反応型のlox72を生成させることができる(図2)。このため、同一染色体上の隣接した部位に新たにloxP配列を導入しても、望んだ領域でのみCre反応を起こすことができることから、染色体上の近傍に高発現用カセットをタンデムに導入することも可能となる。そこで、はじめに上で述べた細胞内Cre直接導入法による変異型loxP配列で挟まれた領域の脱落が可能か検討した。しかし、野生型loxP配列を用いた場合には容易に脱落株を取得することができたのに対して、変異型loxP配列を用いた株ではほとんど脱落株は得られなかった。野生型と変異型の配列をもったプラスミドを試験管内でCreと反応させたところ、変異型は野生型に比べて非常に反応性が低下していることが認められたことから、残念ながら変異型loxPを用いた場合には、Cre直接導入法は利用できないものと考えられた。そこで、Creを細胞内で発現させる方法を試みることにした。この際に、遺伝子導入のたびにCreを導入する必要がないように、Cre発現カセットを染色体に導入することにより、目的遺伝子の導入とマーカー除去株の選抜の2ステップに簡略化する方法を考えた。ただし、この手法では、常にCre発現カセットが細胞内に存在し続けるので、望まないタイミングでのCre反応を

防止するため、Creの厳密な発現制御が求められる。そこで、一度反応すると反応効率が大幅に低下する変異型 *loxP* ペアと、条件的に発現抑制が可能なプロモーターを合わせて使用することで、望まないCre反応を防止することを試みた。

Creの発現プロモーターには、チアミン添加で大幅に発現が抑制される *thiA* プロモーターを採用し、このプロモーター下にCre遺伝子を連結したCre発現カセットを選択マーカーとしてアカパンカビの *pyr4* を持つプラスミドに導入した。このプラスミドで得られた形質転換株をチアミン非存在下で生育させ、Cre発現を誘導したところ、野生型・変異型 *loxP* とともにすべての株でマーカー除去株が取得できた。細胞内でCre遺伝子を発現させた場合にはCre直接導入法よりも多量のCreを核内に送り込めたため、変異型 *loxP* でもCreによる組換え反応が容易に起こったものと考えられる。マーカー除去効率を調べるため、Cre発現カセット導入株の分生子を順次希釈して5'-フルオロオロチン酸 (5-FOA) を含む培地に接種して5-FOA耐性株の出現を観察したところ、変異型 *loxP* では、10個程度の分生子を接種したのもでもマーカー除去株とほぼ同等の生育を示したことから、非常に効率よくマーカー除去ができることが示唆された。糸状菌における相同組換えを利用したマーカーリサイクリングでは、マーカー除去効率が $10^6$ 個の細胞に1つ程度と言われているが<sup>4)</sup>、Cre/*loxP* 反応によればそれよりも非常に高い効率でマーカー除去が可能であると考えられる。多重遺伝子導入においては、マーカー除去操作は何度も繰り返す必要があるため、迅速にマーカー除去が行えることは本手法の大きなメリットである。

### Cre/*loxP* システムによる二次代謝化合物の高生産

上で述べたようなCre発現カセットを持つ株に対して変異型 *loxP* 配列を用いた選択マーカーリサイクリング法の有効性を調べるために、二次代謝化合物生産に関わる生合成遺伝子を複数個麹菌で高発現することを試みた。

二次代謝化合物のモデルとしては、麹菌自身が生産能力を有し、生合成に必要な構成遺伝子数が少ない麴酸を選択した。麴酸は、チロシナーゼの活性を阻害しメラニンの生成を抑制することから、美白剤などの化粧品成分として利用されている有用二次代謝化合物である。麴酸はグルコースから酸化還元反応を経て変換されるが、その変換にはFAD依存性の酸化還元酵素KojAが必須であり、その遺伝子破壊株は麴酸生産能を失うことが報告されている<sup>8)</sup>。 *kojA* 遺伝子と染色体上でクラスターを形成しているトランスポーター遺伝子 *kojT* を破壊した場

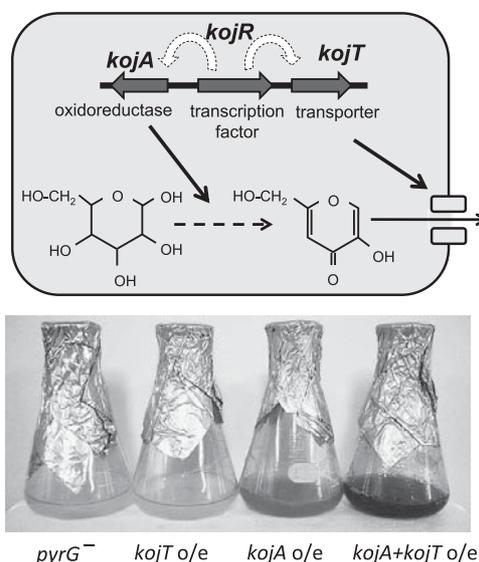


図3. 麴酸の生合成遺伝子クラスターと構成遺伝子の高発現による麴酸の高生産。麴酸はFeイオンと反応して赤色を呈するので、培地にFeCl<sub>3</sub>を加えて麴酸の生産量が判定できる。

合、生育させた培地に鉄イオンを添加した時の呈色が薄くなることからKojTは麴酸の細胞外輸送に関わっていると考えられる<sup>8)</sup>。これら2つの遺伝子は同じクラスター内にある転写因子KojRに制御されていることが明らかになっており、 *kojR* を高発現させることで両者の遺伝子の発現量および麴酸の生産量が増加することが報告されている<sup>9)</sup>。そこで、Cre/*loxP* を利用した多重遺伝子導入システムの応用例として、高発現用プロモーターに連結した *kojA* および *kojT* を選択マーカーをリサイクリングしながら麹菌に導入し、両者を高発現させることにより麴酸の高生産を行った(図3)。

初めに *kojA* と *kojT* をそれぞれ  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*) のプロモーターの下流に連結し、それと変異型 *loxP* の間に挟まれた選択マーカー *pyr4* を持つプラスミドを作製し、Cre発現カセットが染色体に組み込まれているウラシル要求性 (*pyrG*<sup>-</sup>) の麹菌宿主に導入した。得られた形質転換候補株について、 *amyB* プロモーターと *kojA* または *kojT* に結合するプライマーペアを用いてPCR反応を行ったところ、目的のサイズの断片が増幅され、それぞれの発現カセットが導入された株が取得できたことが確認された。 *kojA* 導入株については、チアミンを含まない5-FOA培地で生育させ、5-FOA耐性かつウラシル要求性となった株を選択した。この株に *kojT* 高発現カセットを持つプラスミドを導入し、得られた形質転換体は同じようにチアミンを含まない5-FOA培地で生育させることにより、選択マーカーを脱落させた株

を得ることができた。 *kojT*高発現カセットを導入した株において、選択マーカーを挟み込むよう設計したプライマーペアを用いてPCR反応を行ったところ、チアミンを含まない培地で培養前の菌株では、マーカーが除去された *kojA*発現プラスミド由来の増幅断片 (2.2 kb) とマーカー未除去の *kojT*発現プラスミド由来の増幅断片 (4.5 kb) が、一方チアミンを含まない5-FOA培地で生育してきた株では、 *kojA*発現プラスミド由来の増幅断片 (2.2 kb) とマーカーが除去された *kojT*発現プラスミド由来の増幅断片 (2.5 kb) の増幅が認められ、 *kojA*と *kojT*が同時に染色体上に導入されたことが確かめられた。

*amyB*プロモーター下に連結された *kojA*, *kojT*の発現を誘導するため、炭素源として1%マルトースを含む麴酸生産培地に得られた高発現株の分生子を  $10^6$ 個接種して培養することにより麴酸の高生産を行った。麴酸は金属イオンをキレートする性質を持ち、培地中に  $Fe^{3+}$ イオンを加えると赤色の呈色を示すため、1 mM  $FeCl_3$ を加えておき培養2日後に培地の呈色を観察したところ、 *kojA*単独高発現株と *kojA/kojT*二重高発現株では、宿主株と比較して強い赤色の呈色を示したことから、麴酸生産量が大幅に向上していることが認められた。特に、 *kojA*高発現に加えて *kojT*も高発現させた株では非常に強い赤色の呈色が観察され、麴酸排出トランスポーターの高発現による生産性向上への効果がきわめて大きいことが示された。その一方で、 *kojT*単独高発現株では宿主株と呈色には差が見られず、トランスポーターの高発現のみでは麴酸高生産には影響が見られないことも明らかとなった。

以上述べたように、変異型 *loxP*配列を用いてCreを細胞内で条件的に発現させることにより、効率的な選択

マーカーのリサイクリングが可能となり、二次代謝化合物合成経路のように複数の構成遺伝子からなる遺伝子群を容易に麴菌に導入するシステムを構築することができた。しかし、 *thiA*プロモーターのチアミンによる抑制は完全ではないため、チアミンを添加したCre発現抑制条件下でも僅かにCreが生産され、形質転換過程でのマーカー除去や高発現カセットの脱落が低頻度で起こる恐れがある。そこで、現在は選択マーカーとCreの条件的発現カセットの両者を変異型 *loxP*配列で挟みこんだ断片を搭載した高発現用プラスミドを構築しているところである。このようなプラスミドを用いれば、高発現カセットを導入した後にCreを発現させることにより、選択マーカーとCreの両者を同時に脱落させることが可能となり、安定した多重遺伝子導入株を取得できるものと考えられる。

本研究は、科学研究費補助金・新学術領域研究「生合成マシナリー」(22108007)のもとで行われたものである。

## 文 献

- 1) Machida, M. *et al.*: *Nature*, **438**, 1157 (2005).
- 2) Fujii, R. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1813 (2011).
- 3) 江原直樹ら：日本農芸化学会2012年度大会講演要旨集, p.605 (2012).
- 4) Maruyama, J. and Kitamoto, K.: *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1811 (2008).
- 5) Krappmann, S. *et al.*: *Eukaryot. Cell*, **4**, 1298 (2005).
- 6) Forment, J. V. *et al.*: *Curr. Genet.*, **50**, 217 (2006).
- 7) Mizutani, O. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4126 (2012).
- 8) Terabayashi, Y. *et al.*: *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 953 (2010).
- 9) Marui, J. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 40 (2011).